



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, C07K 14/415, C12Q 1/68, C07K 16/16, C12N 1/21, 9/26, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/04722 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Februar 1998 (05.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04153 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1997 (30.07.97) (30) Prioritätsdaten: 196 30 738.4 30. Juli 1996 (30.07.96) DE 196 41 302.8 7. Oktober 1996 (07.10.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UNIVER- SITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Grabengasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RAUSCH, Thomas [DE/DE]; Alte Eppelheimer Strasse 35-1, D-69115 Heidelberg (DE). KRAUSGRILL, Silke [DE/DE]; Feststrasse 15, D-60316 Frankfurt (DE). GREINER, Steffen [DE/DE]; Leibnitz- trasse 57, D-63071 Offenbach (DE). (74) Anwalt: MÜLLER-BORE & PARTNER; Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: INVERTASE INHIBITOR (54) Bezeichnung: INVERTASE-INHIBITOR (57) Abstract <p>The present invention concerns a nucleic acid which contains at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide, where the polypeptide is enabled to reduce the enzymatic activity of an invertase, the polypeptide itself, as well as transgenic plants which contain this nucleic acid sequence. Moreover, the present invention concerns processes for producing such transgenic plants with reduced, storage-related sucrose loss.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist, das Polypeptid selbst sowie transgene Pflanzen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen transgenen Pflanzen mit reduziertem, lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.</p>			

"Invertase-Inhibitor"**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist, das Polypeptid selbst sowie transgene Pflanzen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen transgenen Pflanzen mit reduziertem, lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.

Während der Lagerung von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*), im Zeitraum zwischen Ernte und Verarbeitung, kommt es durch Atmung bzw. Saccharose-Metabolismus zu einem Saccharose-Verlust von etwa 0,02% pro Tag. Mit diesem Verlust geht ferner eine signifikante Qualitätsminderung infolge der Zunahme reduzierender Zucker, insbesondere Fructose und Glucose, einher (Burba, M. (1976) Atmung und Saccharosestoffwechsel lagernder Zuckerrüben. Zeitschrift für die Zuckerindustrie 26: 647-658). Der erste metabolische Schritt beim Saccharose-Abbau während der Rübenlagerung ist die enzymatische Hydrolyse durch eine vakuoläre Invertase. Dieses Enzym wird in Rüben Gewebe nach Verwundung *de novo* synthetisiert (Milling, R.J., Leigh, R.A., Hall, J.L. (1993) Synthesis of a vacuolar acid invertase in washed discs of storage root tissue of red beet (*Beta vulgaris* L.). J. Exp. Bot. 44: 1687-1694). Da die Hauptmasse der Rüben-Saccharose in den Zellvakuolen lokalisiert ist, spielt die (wund-)induzierte vakuoläre Invertase eine zentrale Rolle für den lagerungsbedingten Saccharose-Verlust.

Es gibt zur Zeit keine befriedigende Lösung für das Problem lagerungsbedingter Saccharose-Verluste (Burba, 1976). Die wichtigsten Maßnahmen im Stand der Technik bestehen in der Einhaltung niedriger Temperaturen (unter 12°C) und

"Invertase-Inhibitor"**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist, das Polypeptid selbst sowie transgene Pflanzen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen transgenen Pflanzen mit reduziertem, lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.

Während der Lagerung von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*), im Zeitraum zwischen Ernte und Verarbeitung, kommt es durch Atmung bzw. Saccharose-Metabolismus zu einem Saccharose-Verlust von etwa 0,02% pro Tag. Mit diesem Verlust geht ferner eine signifikante Qualitätsminderung infolge der Zunahme reduzierender Zucker, insbesondere Fructose und Glucose, einher (Burba, M. (1976) Atmung und Saccharosestoffwechsel lagernder Zuckerrüben. Zeitschrift für die Zuckerindustrie 26: 647-658). Der erste metabolische Schritt beim Saccharose-Abbau während der Rübenlagerung ist die enzymatische Hydrolyse durch eine vakuoläre Invertase. Dieses Enzym wird in Rüben Gewebe nach Verwundung *de novo* synthetisiert (Milling, R.J., Leigh, R.A., Hall, J.L. (1993) Synthesis of a vacuolar acid invertase in washed discs of storage root tissue of red beet (*Beta vulgaris* L.). J. Exp. Bot. 44: 1687-1694). Da die Hauptmasse der Rüben-Saccharose in den Zellvakuolen lokalisiert ist, spielt die (wund-)induzierte vakuoläre Invertase eine zentrale Rolle für den lagerungsbedingten Saccharose-Verlust.

Es gibt zur Zeit keine befriedigende Lösung für das Problem lagerungsbedingter Saccharose-Verluste (Burba, 1976). Die wichtigsten Maßnahmen im Stand der Technik bestehen in der Einhaltung niedriger Temperaturen (unter 12°C) und

definierter Luftfeuchte (zwischen 90 und 96%). Jedoch sind alle bisher eingesetzten Maßnahmen zur Verminderung der lagerungsbedingten Verluste unbefriedigend.

- 5 Ein lagerungsbedingter Umsatz von Saccharose zu den Hexosen Glucose und Fructose und somit ein Saccharose-Verlust findet auch während des sogenannten "cold sweetening" bei Kartoffeln statt. Infolge der Kältebehandlung wird in den Kartoffelknollen eine vakuoläre Invertase induziert, die das Verhältnis von Saccharose zu Hexosen bestimmt (Zrenner, R., Schöler, K., Sonnewald, U.
- 10 (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246-252). Die Bildung der Hexosen als Folge des "cold sweetening" führt zu Qualitätseinbußen bei der Herstellung von beispielsweise Pommes frites.
- 15 Tomatenfrüchte (*Lycopersicon esculentum* Mill.) weisen einen hohen Wassergehalt auf. Dieser ist teilweise durch die osmotisch wirksamen endogenen Zucker (Saccharose und Hexosen) bedingt. Eine Erniedrigung des Gesamtzuckergehaltes durch Hemmung der Invertase-vermittelten Saccharose-Hydrolyse führt zu kleineren wasserärmeren Früchten (Klann, E.M., Hall, B., Bennett, A.B.
- 20 (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology* 112: 1321-1330). Eine Verringerung des Wassergehaltes der Tomatenfrüchte führt zu einer Einsparung von Energiekosten bei der Herstellung von Fruchtkonzentraten (z.B. Ketchup). Da die Reduktion der vakuolären Invertase-Aktivität über Invertase-*antisense* Expression auf Grund des Vorkommens verschiedener Isoformen nur unvollständig
- 25 gelingt, könnte die transgene Einführung eines Invertaseinhibitors große Vorteile mit sich bringen, insbesondere wenn dieser verschiedene Isoformen gleichermaßen hemmt.
- 30 Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein neues System bereitzustellen, das im wesentlichen keine lagerungsbedingten Saccharose-Verluste in Pflanzen hervorruft.